

**研究论文与
科研成果报告**

小鼠脾细胞受电离辐射后合成的 核 RNA 与 DNA 杂交反应的变化

孟 紫 强*

(核工业部辐射防护研究所)

摘要 在 DNA 与核 RNA 进行杂交反应的最初 4 小时内, 小鼠脾细胞受 ^{60}Co γ 线 4 Gy 照射后立即合成的核 RNA 与 DNA 的杂交速度、杂交率及其被 DNA 消耗的速度, 均大于对照核 RNA, 随着杂交反应时间的延长, 这种照后合成的核 RNA 与 DNA 的杂交速度、杂交率及被 DNA 消耗的速度, 均小于对照核 RNA。表明 DNA 不同重复序列区段及同一区段中的不同碱基顺序的转录功能对电离辐射的敏感性不同。随 DNA 重复度的降低, 更多的碱基顺序的转录受到较强抑制。在 DNA 高度重复序列中某些受照前转录不活跃的碱基顺序的转录活性受到 γ 线照射的促进或相对促进, 而受照前转录活跃的碱基顺序的转录活性却受到 γ 线照射的抑制。

关键词 分子杂交; DNA; RNA; γ 线照射; 脾细胞。

前 言

近年来的研究表明, 不同种类 RNA 的生物合成对电离辐射的敏感性不同^[1~2]。从 RNA 与 DNA 的杂交能力来看, 从受照细胞提取的 RNA 与正常细胞 RNA 有明显不同^[3~4]。

小鼠脾细胞在体外经 γ 线照射后, 细胞总 DNA 和总 RNA 的生物合成均受到明显抑制^[5]。本文应用固相核酸分子杂交技术, 对小鼠脾细胞在体外受 γ 线照射后立即转录的核 RNA(nRNA)、未受照小鼠脾细胞在体外同期转录的 nRNA 与 DNA 的杂交反应进行了研究。

材 料 和 方 法

1. 脾细胞悬液制备

将近交系 615 小鼠拉颈致死, 取脾于预冷的 Hanks 盐溶液中, 剪碎, 压滤通过 60 目的不锈钢网, 以 4 层纱布过滤, 制成单细胞悬液。用 Hanks 液洗涤两次后, 将细胞悬于 TC 199 培养液(每 ml 含 100 单位青霉素和 100 μg 链霉素)。

2. 照射

以 ^{60}Co γ 线照射浸于冰水浴中的脾细胞悬液。为提取照后最初 30 min 内细胞合成的氚标记的 nRNA(^3H -nRNA), 剂量为 4 Gy, 剂量率为 0.7 Gy/min, 距离钴源 100 cm。在照后立即提取细胞核 DNA 的实验中, 剂量为 40 Gy, 剂量率为 2 Gy/min。

3. 细胞核的分离

按 Hymer 等(1964)^[6]方法略加修改后进行。将脾细胞悬于 10 倍体积的溶胞液中(0.25 mol/L

* 现在山西大学环境科学系工作。

蔗糖、 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ MgCl_2 , pH7, 含1% Triton x-100), 室温下静置15 min, 离心收集细胞核, 再以不含 Triton x-100 的上述溶胞液洗涤核两次, 即得到完整的、无细胞质污染的核。

4. RNA 标记

从5只小鼠脾制得的10 ml 细胞悬液受照射以后, 立即加入 $0.2 \text{ mCi } ^3\text{H-UR}$ (S.A. $18 \text{ Ci/} 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 中国科学院原子能研究所产)。在 37°C 振摇 30 min, 立即浸于冰水浴中, 用生理盐水洗涤两次, 分离细胞核, 抽提 $^3\text{H-nRNA}$ 。未受照的脾细胞, 按同法标记 RNA。

5. RNA 提取

按 Shearer 等(1967)描述的“热酚法”提取^[7]。

6. DNA 提取

按 Marmur 法^[8]略作修改, 从脾细胞核提取 DNA。

7. DNA 膜的制备

按张玉砚等(1979)描述的 Gillespie 和 Spiegelman (1965) 技术进行^[9-10]。每张小膜直径 6 mm, 含变性 DNA $10 \mu\text{g}$ 左右。

8. RNA/DNA 杂交方法

采用固相核酸分子杂交技术, 以甲酰胺降低反应温度^[9-11]。

(1) 杂交竞争抑制实验 0.2 ml 反应液, 内含 30% 甲酰胺, 0.1% SDS, $5 \mu\text{g}$ 酵母 RNA, $3 \sim 5 \mu\text{g}$ $^3\text{H-nRNA}$, 及不同量的非标记的竞争 nRNA, 盐浓度为 $2 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}: 0.15 \text{ mol/L NaCl}, 0.015 \text{ mol/L}$ 柠檬酸钠)。杂交后膜的洗涤和 RNA 酶处理方法均同文献^[9]。膜烘干后, 用 Beckman L 8-9000 液闪计数器测放射性。

(2) nRNA 消耗实验 按 Greene 等(1970)的方法^[12]略作修改后进行。每小管内 0.4 ml 反应液含 5 或 $20 \mu\text{g } ^3\text{H-nRNA}$, 不加非标记的竞争 nRNA, 其余成分同上。每小管加 2 张 DNA 膜, 1 张无 DNA 的空白膜, 每张 DNA 膜上的放射性计数减去同一小管中空白膜的放射性计数。在 45°C 杂交反应 4 或 24 小时后, 将小管中的膜取出, 再放入另外的 DNA 膜, 如此重复 4~5 次。杂交过后的膜如上进行洗涤、酶处理和测量。

(3) nRNA/DNA 杂交率实验 0.2 ml 反应液, 含 5 或 $20 \mu\text{g } ^3\text{H-nRNA}$ (与 DNA 的数量比为 $1/4$ 或 1), 无竞争 nRNA, 其余成份同上。每小管加 2 张 DNA 膜、1 张无 DNA 空白膜, 在 37°C 分别进行 4、24、48、72 小时杂交反应。然后, 如上处理和测量。

9. 杂交分子 T_m 值测定

按张玉砚等(1979)的方法进行^[9]。

结果 及 分 析

1. 杂交竞争抑制实验

正常脾细胞 nRNA 对脾细胞受照后立即合成的和未受照脾细胞同期合成的 $^3\text{H-nRNA}$ 有相似的竞争性(见图 1)。这意味着小鼠脾细胞受 γ 线照射后立即合成的 nRNA 所包含的与 DNA 重复序列互补的碱基顺序, 与正常 nRNA 无异。表明脾细胞受照后未有异常 nRNA 合成。

2. nRNA/DNA 杂交率

(1) 与对照 nRNA 相比, 脾细胞照后合成的 nRNA 与 DNA 的杂交速度较快, 且能在较短的反应时间达到杂交饱和(见图 2)。DNA 与照后合成的 nRNA、DNA 与对照 nRNA, 达到杂交

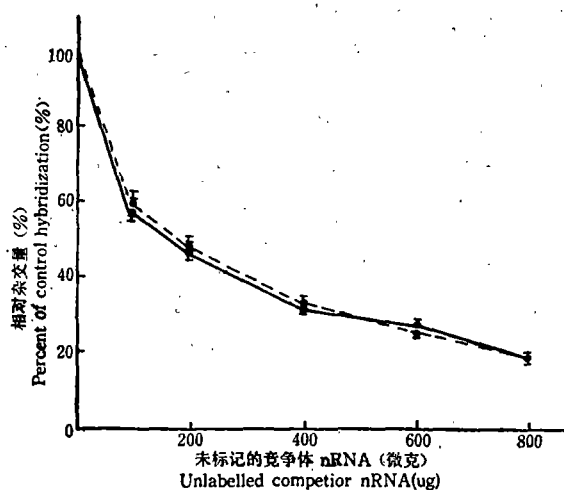


图1 小鼠脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA与正常脾细胞nRNA的杂交竞争抑制作用。DNA和未标记的竞争nRNA均从未受照的小鼠脾细胞提取。标记的nRNA是未受照脾细胞(-----)或受照脾细胞(·—·)合成的 ^3H -nRNA。

Fig. 1 Competition between the unlabelled nRNA from unirradiated mouse spleen cells and ^3H -nRNA synthesized in irradiated (·—·) or unirradiated (-----) mouse spleen cells in the hybridization reaction of them with DNA from unirradiated mouse spleen cells. The each value is $\bar{x} \pm \text{SD}$.

饱和和所需反应时间,当DNA与nRNA浓度比为1时,分别为24和48小时;当DNA与nRNA浓度比为4时,分别为48和72小时(见图2)。

(2) DNA与两种nRNA杂交率的比值表明,当杂交反应时间不超过DNA与照后合成的nRNA杂交饱和和所需的反应时间时,照后合成的nRNA与DNA的杂交率大于对照nRNA与DNA的杂交率;相反,当杂交反应时间超过DNA与照后合成的nRNA杂交饱和和所需的反应时间时,则照后合成的nRNA与DNA的杂交率比对照nRNA与DNA的杂交率要低(表1、图2)。

3. DNA对nRNA的消耗实验

(1) 从受40 Gy γ 线照射的小鼠脾细胞提取的核DNA和从未受照小鼠脾细胞提取的核DNA,二者对脾细胞受照后立即合成的nRNA的消耗速度相似,二者对未受照脾细胞合成的nRNA的消耗速度也相似(见图3)。表明小鼠脾细胞DNA重复序列的碱基顺序经 γ 线照射40 Gy后,未发生可检出的改变。

(2) 如每次的杂交反应为4小时,则上述两种DNA对照后合成的nRNA的消耗速度,

表1 小鼠脾细胞受照后合成的nRNA与DNA杂交率的改变

Table 1 The changes of percentage hybridization of DNA and nRNA synthesized in irradiated mouse spleen cells

杂交时间(小时) Hybridization time (hour)	实验次数 Number of experiments	杂交百分率比值(均值 $\pm$ 标准差) Ratio of percentage hybridization ($\bar{x} \pm \text{SD}$) [*]	
		DNA:nRNA = 1	DNA:nRNA = 4
4	3	122.92 $\pm$ 4.67	131.08 $\pm$ 10.97
24	3	95.51 $\pm$ 1.10	105.73 $\pm$ 7.46
48	3	83.07 $\pm$ 4.33	114.98 $\pm$ 3.30
72	3	84.89 $\pm$ 0.34	94.14 $\pm$ 3.12

* 杂交百分率比值 = $\frac{\text{DNA与受照细胞合成的nRNA杂交率}}{\text{DNA与未受照细胞合成的nRNA杂交率}} \times 100\%$ 。

DNA从未受照小鼠脾细胞提取。

* Ratio of percentage hybridization = $\frac{\text{percentage hybridization of DNA and } ^3\text{H-nRNA from irradiated cells}}{\text{percentage hybridization of DNA and } ^3\text{H-nRNA from unirradiated cells}} \times 100\%$

The DNA was extracted from unirradiated mouse spleen cells.

比对照nRNA的消耗速度要快(见图3)。

(3) 若每次杂交反应进行24小时,则两种nRNA被DNA消耗的速度未表现差异(见图3)。

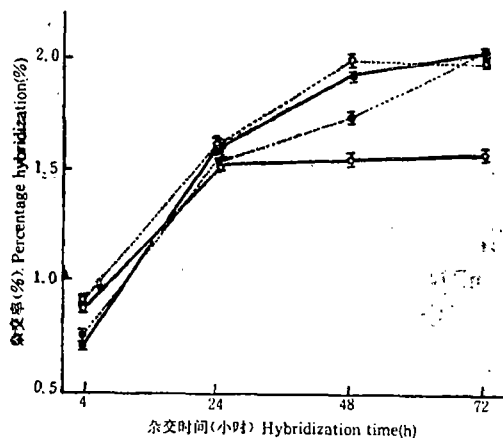


图2 电离辐射对小鼠脾细胞 nRNA/DNA 杂交率的影响。

DNA 与 nRNA 比值为 1 (20 μ g/20 μ g): 受照射的(○——○)和未照射的(●——●)脾细胞合成的 ^3H -nRNA;

DNA 与 nRNA 比值为 4 (20 μ g/5 μ g): 受照射的(○……○)和未照射的(●……●)脾细胞合成的 ^3H -nRNA。

杂交率 = [滤膜结合的 ^3H -nRNA (cpm)] / 加入杂交液中的 ^3H -nRNA (cpm) $\times$ 100%

Fig. 2 Effect of ionizing irradiation on percentage hybridization of DNA and ^3H -nRNA from mouse spleen cells. DNA/nRNA ratio is 1 (20 μ g/20 μ g): ^3H -nRNA synthesized in irradiated (○——○) and unirradiated (●——●) cells; DNA/nRNA ratio is 4 (20 μ g/5 μ g): ^3H -nRNA synthesized in irradiated (○……○) and unirradiated (●……●) cells. The each point is $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Percentage hybridization = [Filter bound ^3H -nRNA (cpm)/nRNA added (cpm)] $\times$ 100%

与未照脾细胞合成的 ^3H -nRNA 的杂交分子, 其 T_m 值均为 70 $^{\circ}\text{C}$ (见图4)。受照脾细胞 DNA 与照后脾细胞合成的 ^3H -nRNA 的杂交分子的 T_m 值也为 70 $^{\circ}\text{C}$, 与未照脾细胞合成的 ^3H -nRNA 的杂交分子的 T_m 值为 70.5 $^{\circ}\text{C}$ (见图5)。

讨 论

应用核酸分子杂交技术研究电离辐射对基因结构及其功能的影响的报道甚少。Meltz 等(1971)曾报道 X 线照射对白血病细胞 RNA

这是由于杂交反应时间的延长, 掩盖了两种 nRNA 被 DNA 消耗时在杂交反应最初阶段所存在的差异。

4. 杂交分子 T_m 值测定

固相 DNA 与 ^3H -nRNA 杂交反应 20 小时后, 测定其杂交分子的 T_m 值。未照脾细胞 DNA 与照后脾细胞合成的 ^3H -nRNA 的杂交分子, 及

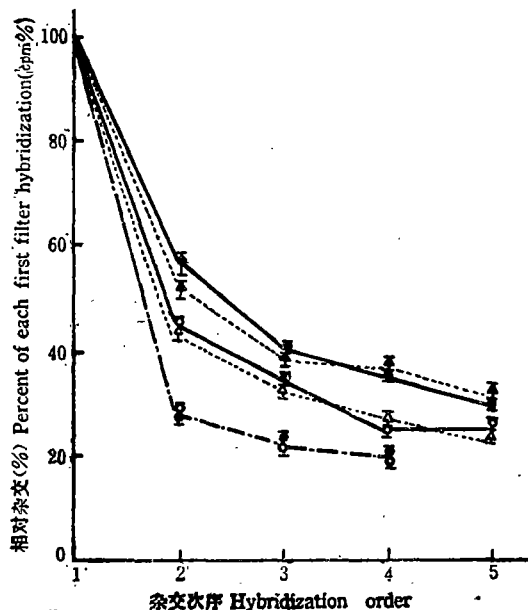


图3 受照与未受照小鼠脾细胞合成的 ^3H -nRNA 被 DNA 消耗的速度

每滤膜杂交反应时间为 4 小时: 未照细胞 DNA 对未照细胞 ^3H -nRNA (●——●) 和受照细胞 ^3H -nRNA (○——○) 的消耗; 受照细胞 DNA 对未照细胞 ^3H -nRNA (▲……▲) 和受照细胞 ^3H -nRNA (△……△) 的消耗。

Fig. 3 Exhaustion rates of ^3H -nRNA synthesized in unirradiated and irradiated mouse spleen cells by mouse spleen DNA.

Hybridization time was 4 hours for each filter: ^3H -nRNA from the irradiated cells (○——○) and from the unirradiated cells (●——●) exhausted by DNA from the unirradiated cells; ^3H -nRNA from the unirradiated cells (▲……▲) and from the irradiated cells (△……△) exhausted by DNA from the irradiated cells.

每滤膜反应时间为 24 小时: 未照细胞 DNA 对未照细胞 ^3H -nRNA (●——●) 和受照细胞 ^3H -nRNA (○——○) 的消耗。

Hybridization time was 24 hours for each filter: ^3H -nRNA from the unirradiated cells (●——●) and from the irradiated cells (○——○) exhausted by DNA from the unirradiated cells.

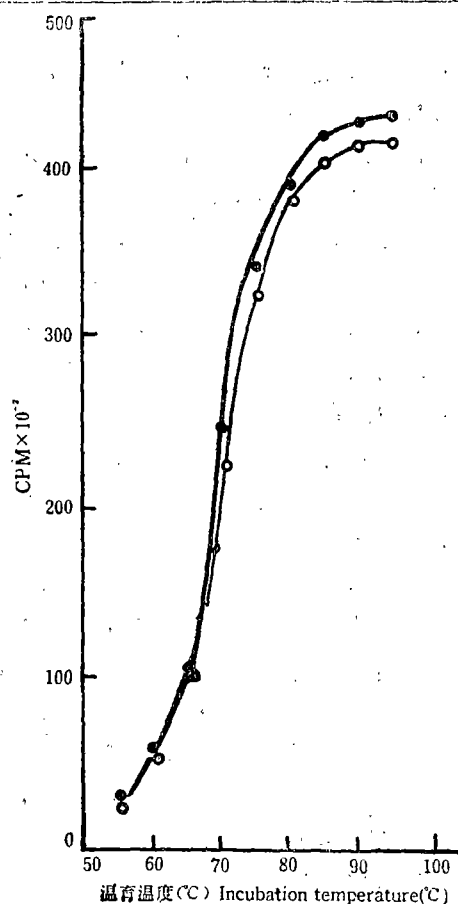


图4 DNA与 ^3H -nRNA杂交分子的溶解曲线。

DNA从未受照脾细胞的核提取。

^3H -nRNA是未受照(●—●)和受照(○—○)脾细胞合成的。

Fig. 4 Melting curves of DNA ^3H -nRNA hybrids.

DNA from unirradiated mouse spleen cells.

^3H -nRNA synthesized in unirradiated

(●—●) and irradiated (○—○)

mouse spleen cells.

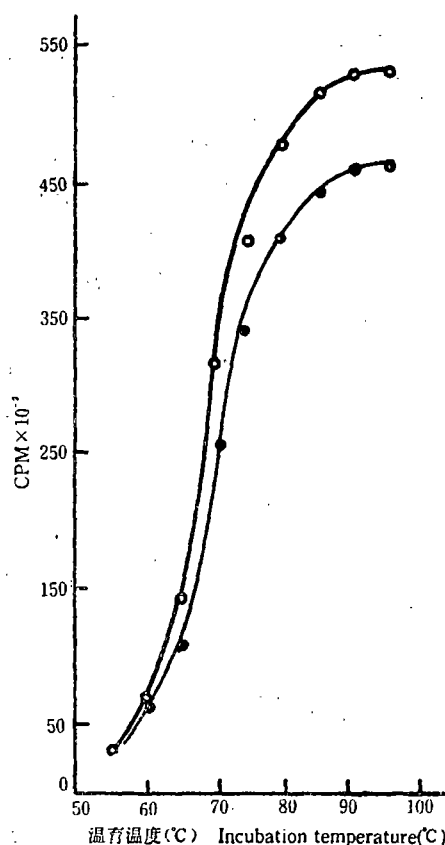


图5 DNA与 ^3H -nRNA杂交分子的溶解曲线。

DNA从受照脾细胞的核提取。

^3H -nRNA是未受照的(●—●)和受照的(○—○)脾细胞合成的

Fig. 5 Melting curves of DNA ^3H -nRNA hybrids.

DNA from 40 Gy γ -irradiated mouse spleen cells in vitro.

^3H -nRNA synthesized in unirradiated (●—●)

and irradiated (○—○) mouse spleen cells.

与DNA杂交率的影响^[4]。Hanson等(1976)报道了X线照射大鼠后其胸腺nRNA与DNA杂交能力的改变^[3]。本文对小鼠离体脾细胞受 γ 线照射后立即合成的nRNA与DNA杂交反应所发生的变化进行了研究,其中DNA对脾细胞受照后合成的nRNA消耗动力学方面的研究,尚未见文献报道。

实验结果指出,脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA与DNA的杂交较迅速,且在较短的反应时间内即达到杂交饱和。在4小时杂交反应时,脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA与DNA的杂交率大于对照 ^3H -nRNA,表明脾细胞受照后合成的总nRNA中与DNA高度重复序列区段某些碱基顺序互补的nRNA增多;随杂交反应时间的延长,脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA与DNA的杂交率逐低于对照 ^3H -nRNA,表明照后合成的总 ^3H -nRNA中与重复度较低的DNA序列区段某些碱基顺序互补的nRNA减少。这些结果反映了DNA不同重复序列区段其转录nRNA的活性,对

γ 线照射的敏感性不同。

DNA 对 ^3H -nRNA 的消耗实验指出, 当实验是以每次杂交 4 小时的方式进行时, 脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA 被 DNA 消耗的速度较对照 ^3H -nRNA 消耗迅速; 当以每次杂交 24 小时的方式进行时, 照后细胞合成的 ^3H -nRNA 被 DNA 消耗的速度减慢, 对照 ^3H -nRNA 被 DNA 消耗的速度加快, 从而掩盖了在进行杂交反应的最初 4 小时之内两种 ^3H -nRNA 被 DNA 消耗速度的差异。RNA 被 DNA 消耗的速度, 取决于: (1) 能迅速与 DNA 杂交的 RNA 种类在总 RNA 中所占比率较大时, 在杂交反应的最初阶段该总 RNA 被 DNA 消耗较快; (2) 在一定杂交反应时间里, 在总 RNA 中能与 DNA 杂交的 RNA 种类愈多, 其被 DNA 消耗的愈快; (3) 在与 DNA 杂交能力类似的情况下, 重复频率愈高的 RNA 种类, 被 DNA 消耗的愈慢。

在短促的 4 小时杂交反应中, 脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA 与 DNA 的杂交率高, 被 DNA 消耗的也快。在此条件下, ^3H -nRNA/DNA 杂交率高, 表明脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA 总体中能迅速与 DNA 高度重复序列杂交的 ^3H -nRNA 所占比率较高, 亦即 γ 线照射对 DNA 高度重复序列区段中的某些碱基顺序转录 nRNA 的功能有促进作用; 在此条件下, 照后合成的 ^3H -nRNA 被 DNA 消耗的快, 似表明在对照 ^3H -nRNA 总体中能迅速与 DNA 高度重复序列杂交的那些重复频率较高的 ^3H -nRNA 种类, 在照后合成的 ^3H -nRNA 中它们的重复频率下降, 亦即 γ 线照射对 DNA 高度重复序列区段中转录活跃的碱基顺序转录 nRNA 的能力有抑制作用, 使其转录的 ^3H -nRNA 频率减小, 被 DNA 消耗加快。因此, 那些在高度重复序列区段中转录 nRNA 活性较低的碱基顺序的转录活性才有可能受到 γ 线照射的促进或相对促进, 使照后合成的 ^3H -nRNA 能与更广泛的高度重复的 DNA 进行杂交, 所以照后合成的 ^3H -nRNA 不但与 DNA 杂交率高, 而且被 DNA 消耗的也快。由于本文杂交竞争抑制实验结果表明照后合成的 nRNA 中未见异常 nRNA 合成, 所以 γ 线照射对在未照情况下不进行转录的碱基顺序的转录功能似没有激活作用。

实验结果指出, 杂交反应时间延长后, 脾细胞受照后合成的 ^3H -nRNA 与 DNA 的杂交率较对照 ^3H -nRNA 低, 被 DNA 消耗的速度减慢。其与 DNA 杂交率减少, 表明随着 DNA 重复度的降低, 其转录活性对 γ 线照射比高度重复序列更为敏感, 使其转录受抑; 导致照后合成的 ^3H -nRNA 与重复度较低的 DNA 序列的杂交率减少。其被 DNA 消耗减慢, 可能是由于在 DNA 重复度较低的区段中不同碱基顺序的转录活性对 γ 线照射的敏感性不同所致, 某些碱基顺序的转录能力对 γ 线照射的忍受力较强, 使其合成的 ^3H -nRNA 种类在总的 ^3H -nRNA 中的比率增高, 导致被 DNA 消耗的速度减慢。

总之, 实验结果表明, DNA 不同重复序列区段及同一区段的不同碱基顺序的转录活性对 γ 线照射的敏感性不同。根据实验结果, 我们设想 DNA 高度重复序列中转录活跃的碱基顺序的转录能力对 γ 线照射更为敏感, 而转录不活跃的碱基顺序的转录活性对 γ 线照射较不敏感甚至受到 γ 线照射的促进。随 DNA 重复度的降低, 其转录能力对 γ 线照射比 DNA 高度重复序列区段更为敏感, 但仍有部分碱基顺序的转录能力对电离辐射有较强的抵抗能力。

参 考 文 献

- [1] S. G. Ernst, et. al, Biochim. Biophys. Acta., 563, 193(1979).
- [2] R. Bases, Radiat. Res., 43, 265(1970).
- [3] K. P. Hanson, et. al, Int. J. Radiat. Biol., 30(2), 129(1976).
- [4] M. L. Meltz, et. al, Int. J. Radiat. Biol., 19(3), 287(1971).
- [5] 苏燎原等, 细胞生物学杂志, 3, 28(1981).

- [6] W. C. Hymer, et. al, J. Histochem. Cytochem., 12, 359(1964).
[7] R. W. Shearer, et. al, Biochemistry, 6(1), 283(1967).
[8] J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 208(1961).
[9] 张玉砚等, 生物化学与生物物理进展, 2, 27(1979).
[10] D. Gillespie, et. al, J. Mol. Biol., 12, 829(1965).
[11] J. Bonner, et. al, Biochemistry, 6(12), 3650(1967).
[12] R. F. Greene, et. al, Biochim. Biophys. Acta., 217, 447(1970).

(1985年6月3日收到)

HYBRIDIZATION CHANGE OF DNA AND NUCLEAR RNA SYNTHESIZED IMMEDIATELY AFTER IONIZING IRRADI- ATION IN SPLEEN CELLS ISOLATED FROM 615 MICE

Meng Ziqiang

(Institute for Radiation Protection, MNI.)

ABSTRACT DNA hybridization with nuclear RNA(nRNA) synthesized immediately after ^{60}Co Gamma-irradiation in the spleen cells freshly isolated from inbred line 615 mice was investigated, using the technique of Gillespie and Spiegelman (J. Mol. Biol., 12, 829, 1965).

In RNA/DNA hybridization percentage experiment, it was showed that the hybridization of normal DNA with labelled nRNA synthesized in irradiated cells reached the saturation point at a much faster rate than with labelled normal nRNA (fig. 1). The hybridization percentage of nRNA synthesized in irradiated cells was higher than that of normal nRNA during the different reaction time before the saturation point of DNA with nRNA synthesized in irradiated cells, but it was lower than that of normal nRNA after the point. It was assumed that the transcription of some base sequences in the zone of high repetitive DNA sequences was stimulated, however, the transcription of some base sequences in the zone of low repetitive DNA sequences was seriously inhibited.

Measurements of the exhaustion rates of pulse-labelled nRNA were carried out as described by Greene and Flickinger Biochim. (Biophys. Acta, 217, 447, 1970). In these studies, pulse-labelled nRNA synthesized in unirradiated and irradiated cells were compared by exhaustion with DNA at hybridization time of 4 or 24 hours. When the hybridization time was 4 hours, the nRNA synthesized in irradiated cells displayed a faster exhaustion rate than the control nRNA. But if the hybridization time was 24 hours, the exhaustion rate of nRNA synthesized in irradiated cells reduced. These results demonstrated that Gamma-irradiation changed the proportion of transcription of some nRNA species and implayed that the sensitivities of the transcription activeties of the different repetitive DNA sequences to Gamma-irradiation were different, and so were the transcription activeties of the different base sequences in the same repetitive DNA sequences. We suggested that Gamma-irradiation stimulated the transcription activeties of some base sequences in the zone of high repetitive DNA sequences which were low before Gamma-irradiation, but Gamma-irradiation inhibited the transcription activeties of some base sequences in the zone of high repetitive DNA sequences which were high before the irradiation.

KEY WORDS Hybridization; DNA; RNA; Gamma-irradiation; Spleen cells.